ChinaXiv合作期刊

chinaXiv:201809.00104v1

DOI:10.11931/guihaia.gxzw201806044

枸骨 *IcFPS1* 基因的克隆、表达及生物信息学分析

马良琼[1]，曾慧[1]，罗彩霞[1]，张威威[1*]，许锋[1]，程水源[2]
（1. 长江大学 园艺园林学院，湖北 荆州 434025； 2. 武汉轻工大学 生物与制药工程学院，湖北 武汉 430023）

摘要：法尼基焦磷酸合酶（Farnesyl diphosphate synthase，FPS）是三萜皂苷生物合途径的一个关键酶。为了研究 FPS 基因在枸骨中的功能，该研究采用 PCR 技术将一个 *FPS* 基因的 cDNA 序列从枸骨叶中分离出来，并命名为 *IcFPS1*；测序结果分析发现，扩增获得的 *IcFPS1* 基因 cDNA 长度为 1591bp，包含一个完整的开放阅读框，大小为 1029 bp。序列分析发现枸骨 *IcFPS1* 基因编码 342 个氨基酸，分子量和等电点分别为 39.58 kDa 和 5.18。理化性质预测分析发现 IcFPS1 蛋白不含信号肽，不含有跨膜区域，该 IcFPS1 蛋白为亲水性蛋白质。序列多重比对发现，IcFPS1 蛋白质与其他植物的 FPS 蛋白质高度同源，有共同的保守区域和氨基酸序列，其中与西洋参 FPS 序列的相似性高达 89%。系统进化树分析也表明枸骨 FPS 蛋白与同属于被子植物的五加科植物 FPS 蛋白亲缘关系较近，表明 *FPS* 基因在进化过程中相对比较保守。蛋白调控网络预测分析结果显示该蛋白可能与 IPP1、IPP2、GGPS3、GGPS6 和 ERA1 相互作用，参与类异戊二烯的合成代谢过程。实时荧光定量 PCR 分析显示，*IcFPS1* 基因在枸骨各个组织部位中均有表达，其中在枸骨根中表达量最高，在茎和雌花中表达量最低。该研究为后续探究植物三萜皂苷生物合成的分子机理研究奠定了理论基础。

关键词：枸骨，法尼基焦磷酸合酶，三萜皂苷，克隆，表达

Cloning, expression and bioinformatics analysis of *IcFPS1* gene from *Ilex cornuta*

MA Liangqiong[1], ZENG Hui[1], LUO Caixia[1], ZHANG Weiwei[1*], XU Feng[1], CHENG Shuiyuan[2]
(1. *College of Horticulture and Gardening, Yangtze University*, Jingzhou435025, Hubei, China; 2. *School of Biology and Pharmaceutical Engineering, Wuhan Polytechnic University*, Wuhan 430023, China)

收稿日期：2018-06-27

基金项目：国家自然科学基金(31500546); 长江大学大学生创新创业训练计划项目(2017077)[Supported by the National Natural Science Foundation of China (31500546); Yangtze University Training Program of Innovation and Entrepreneurship for Undergraduates (2017077)]。

作者简介：马良琼（1986-），女，陕西汉中人，在读硕士研究生，主要从事植物资源开发利用，E-mail: maliangqiong@163.com。

***通讯作者：**张威威（1981-），男，博士，讲师，主要从事林木分子生物学方面的研究，E-mail：wwzhangchn@163.com。

Abstract: Farnesyl diphosphate synthase (FPS) is a key enzyme in the biosynthesis of triterpene saponins, it can promote the biosynthesis triterpenoid saponins in plants. In order to study the function of *FPS* gene in *Ilex cornuta*, we isolated a *FPS* gene from *Ilex cornuta*, and carried out bioinformatics analysis and expression analysis. In this study, PCR was used to isolate the cDNA sequence of a *FPS* gene from the leaves of *Ilex cornuta*, and the gene was named as *IcFPS1*. DNA sequencing results showed that the amplified cDNA of *IcFPS1* gene was 1591 bp. Sequencing analysis revealed the *IcFPS1* gene contains a complete open reading frame, and the open reading frame is 1 029 bp in length, encoding 342 amino acids. The molecular weight and isoelectric point of predicted IcFPS1 protein were 39.58 kDa and 5.18, respectively. Physical and chemical properties analysis revealed that IcFPS1 protein is a hydrophilic protein, and it does not contain a signal peptide. There is also no transmembrane region of the IcFPS1 protein. The multiple alignment of FPS sequences with BLASTP and Align X revealed that the IcFPS1 protein is highly homologous to other known FPS proteins from different plant species, and they have common conserved regions and amino acid sequences. The similarity between the IcFPS1 and the *Panax quinquefolius* FPS sequence was as high as 89%. Phylogenetic tree analysis showed that the FPS protein of the *Ilex cornuta* is closely related to FPS proteins of the Araliaceae family belonging to the angiosperm. These results indicate that the *FPS* gene is conserved during evolution. Protein-protein interaction network analysis showed that the IcFPS1 protein is involved in the synthesis pathway of isoprenoids, which may be the same as IPP1, IPP2, GGPS3, GGPS6 and ERA1 proteins. Real-time quantitative PCR analysis showed that *IcFPS1* gene was expressed in all tested tissues of *Ilex cornuta*, while the expression level of *IcFPS1* gene in different tissues was different. *IcFPS1* gene has the highest expression in roots, but is less expressed in the stems and female flowers of *Ilex cornuta*. This study laid a theoretical foundation for the study of the molecular mechanism of plant triterpenoid saponin biosynthesis in future.

key words: *Ilex cornuta*, Farnesyl diphosphate synthase, triterpene saponin, cloning, expression.

chinaXiv:201809.00104v1

枸骨（*Ilex cornuta*）为冬青科灌木或乔木，四季常青，可用于绿化。同时，枸骨在传统上也是常用中药之一，枸骨根、叶、果实等组织均可入药，在常见病痛治疗方面有较好疗效（彭国全等，2011）。根据《本草拾遗》记载，枸骨叶具备清热养阴，补肝益肾，祛风湿等功效，在肺痨咳嗽，劳伤失血等疾病治疗方面也有很好应用（左文健等，2011）。枸骨叶中含有许多次生代谢物质，包括三萜及其皂苷、黄酮及其多酚类化合物(李国文等，2011)。因此枸骨具有重要的商业和药用价值。

枸骨叶中主要成分之一三萜皂苷也是是广泛分布于人参、灵芝、三七、墨旱莲等药用植物中的一类重要次生代谢产物，属于中药植物的主要活性成分之一，具有抗癌、抗氧化、消炎解毒等功效（张召宝等，2015）。整个三萜生物合成过程涉及法尼基焦磷酸合酶、鲨烯合酶、鲨烯环氧酶或单加氧化酶、氧化鲨烯环化酶等一系列酶的催化。法尼基焦磷酸合酶（Farnesyl diphosphate Synthase，FPS）是一种异戊烯基转移酶，它催化五碳原子的二甲丙烯基焦碟酸和异戊烯基焦磷酸以头尾连续缩合反应，进而形成碳原子的法尼基焦磷酸，成为植物体内皂苷、倍半萜、留体、橡胶等许多萜类衍生物质的合成前体（Cunillera et al, 1996）。至今，在洋甘菊（杨秀梅，2013）、拟南芥（Cunillera et al, 1996）、刺五加（周秘等，2013）、绞股蓝（蒋东等，2014）、三七（陈莉等，2006）等许多植物中已经进行了 *FPS* 基因的分离和功能验研究，研究结果证实 FPS 是植物三萜皂苷生物合成途径的一个关键酶，能够调控植物类异戊二稀途径，促进三萜皂苷的合成。截至目前，在枸骨上尚且没有发现

FPS 基因的研究报道，克隆 *FPS* 基因并进行功能研究是揭示 *FPS* 基因在枸骨三萜生物合成途径中功能的前提。在本项目中，我们对枸骨 *FPS* 基因进行了克隆、对其序列进行了生物信息学分析、并进行了组织表达分析。研究结果可为弄清 *FPS* 基因在枸骨三萜类生物合成中的调节作用奠定基础。

1. 材料与方法

1.1 材料

本研究中的枸骨材料采摘于长江大学校园，收集五种不同的组织（根、茎、叶、雄花、雌花）用于 RNA 提取和基因表达分析，采摘的材料立即在液态氮中速冻并储存在−80°C 超低温冰箱中待用。

1.2 方法

1.2.1 RNA 的提取和 cDNA 合成

将枸骨的不同器官（根、茎、叶、雄花、雌花）在液氮中磨成细粉末状，参照 Plant RNA Extraction Kit（TaKaRa, Mini BEST）试剂盒说明书提取各组织总的 RNA。分光光度计和琼脂凝胶电泳检测质量较好的 RNA 用于 cDNA 的合成。枸骨 cDNA 的合成以 RNA 为模板，采用 PrimeScript™ 的 cDNA 反转录试剂盒（TaKaRa, Dalian, China）完成。

1.2.2 枸骨 *IcFPS1* 基因的克隆

根据枸骨的转录组测序数据设计并合成 *FPS* 基因扩增特异引物，上游引物为：IcFPSF1（5'-ATTAAGACCATCTGTGGAGCCTAGC-3'），下游引物为：IcFPSR1（5'-GGGTGACAGGTTTGTATAGCATCCA -3'）。PCR 反应体系 25 μL，包括 ddH_2O 16.5 μL，10×Buffer 2.5 μL，$MgCl_2$ 2.0 μL，dNTP 0.5 μL，上下游引物各 1 μL，cDNA 模板 1 μL，Taq DNA 聚合酶 0.5 μL。PCR 反应条件为：94°C 预变性 4 min；94°C 变性 30 s，58°C 退火 40 s，72°C 延伸 90 s，共 32 个循环；最后 72°C 延伸 10 min，4°C 结束。PCR 扩增结果用 1%的凝胶电泳检测，利用琼脂糖凝胶回收试剂盒回收纯化扩增产物，纯化产物连接到从宝生物购买的 pMD19-T 载体上，并转化到 DH5α感受态细胞中。转化后的感受态细胞经活化苏醒后被均匀地涂抹于含有 Amp 的 LB 的培养皿中，挑取菌落进菌液活化，并进行菌液 PCR 扩增验证，阳性结果菌液送往上海生物工程公司进行测序。

1.2.3 生物信息学分析

IcFPS 基因 cDNA 序列和蛋白质序列比对利用在线工具 NCBI-blast（http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BlAST/）完成。运用 Vector NTI Suite v11.5 和 DNAMAN 8 来分析 *IcFPS1* 基因的 cDNA 序列，进行蛋白质翻译。IcFPS1 蛋白质理化学性质的分析采用工具 ProtParam tool（http://web.expasy.org/protparam/）进行。信号肽预测、疏水性分析、跨膜区域预测分别用在线工具 SignalP 4.1 Server、ProtScale 和 TMHMM Server v. 2.0 完成。蛋白质二级结构分析借助 SOPMA 工具实现。利用软件 Align X（Vector NTI Suite V 11.5）对多种植物的 FPS 蛋白进行多重比对分析，利用 Clustal X 2.0 和 MEGA 6.0 软件采用邻接（NJ）方法构建 *FPS* 基因系统进化树，使用 Bootstrap 对系统树可信性进行检验，重复 1000 次。应用 STRING 交互式数据库（https://string-db.org/）构建候选蛋白与相关蛋白的相互作用网络，分析预测 IcFPS1 蛋白在互作网络中的作用关系，保留可信度大于 0.700 相互作用关系， 用 Cytoscape 3.61 调整展示互作网络图。

1.2.4 实时荧光定量 PCR 分析

使用 RNA 提取试剂盒（Plant RNA Extraction Kit）从五种不同的组织器官样品中提取总 RNA。根据 *IcFPS1* 基因的 cDNA 序列设计实时荧光定量引物，上游引物为 IcFPSRT-S：5'-ACAGATTACCGAAGGTTGGTATG-3'，下游引物为 IcFPSRT-A：5'-GGTTGTCTGGAATTCTACCTCATTA-3'。qRT-PCR 内参基因选用的是 *IcGAPDH*，上游

chinaXiv:201809.00104v1

引物序列 IcGAPDH-S: 5'-TATCAACGGCTTCGGTCGCA-3'，下游引物序列 IcGAPDH-A: 5'-GGACGGAGTCGTACTTGAGCAT-3'。引物送往上海生工生物技术有限公司合成。实时荧光定量 PCR 在杭州博日科技有限公司的 Linegene9600 PCR 仪上进行，反转录和荧光定量 PCR 的操作依照试剂盒 PrimeScript™ RT reagent Kit with gDNA Eraser 和 SYBR® Premix Ex Taq™ II 的操作步骤说明书逐步进行。反应程序为 95°C、30 s，95°C、5 s；60°C、30 s，共 40 个循环。每种样品三次取样重复，三次技术重复，并分别设置一个阴性对照（模板为 ddH_2O）。*IcFPS1* 基因的相对表达水平计算通过使用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法完成（Livak & Schmittgen, 2001）。

2. 结果与分析

2.1 *IcFPS1* 基因 cDNA 克隆与序列分析

利用特异性引物，以反转录 cDNA 为模板，通过 PCR 技术从枸骨中克隆得到一条 *FPS* 基因序列，通过 NCBI 网站的在线程序 Blast 比对分析显示该 cDNA 序列与其他物种的 FPS 基因序列具有较高的相一致性，克隆获得的 cDNA 序列为枸骨的 *FPS* 基因，命名为 *IcFPS1*。此 cDNA 序列长度为 1591 bp，包含 1029 bp 的开放阅读框，编码 342 个氨基酸（图 1）。

chinaXiv:201809.00104v1

chinaXiv:201809.00104v1

```
1       attaagaccatctgtggagcctagcagtttttctctccctctgtcgagaacaATGAGCGATCTGAAGTCGAAAT
                                                            M  S  D  L  K  S  K
76      TTCTGGAGGTCTACTCAGTCCTGAAATCGGAGCTACTCAATGACCCTGCTTTCGAGTTCACCGACGATTCTCGTC
        F  L  E  V  Y  S  V  L  K  S  E  L  L  N  D  P  A  F  E  F  T  D  D  S  R
151     AATGGATCGAACGGATGCTGGACTACAATGTACCTGGAGGAAAGCTGAACCGAGGGCTTTCTGTCATTGACAGCT
        Q  W  I  E  R  M  L  D  Y  N  V  P  G  G  K  L  N  R  G  L  S  V  I  D  S
226     ACAAGTTGCTGAAAGAAGGAAAAGAATTGACCGACGATGAAGTTTTTCTGGCTTGTGCACTTGGTTGGTGCATCG
        Y  K  L  L  K  E  G  K  E  L  T  D  D  E  V  F  L  A  C  A  L  G  W  C  I
301     AATGGCTTCAAGCATTTTTCTTGTTCTTGACGATATCATGGATAACTCTCATACAAGGCGTGGTCAACTCTGTT
        E  W  L  Q  A  F  F  L  V  L  D  D  I  M  D  N  S  H  T  R  R  G  Q  L  C
376     GGTACAGATTACCGAAGGTTGGTATGATTGCTGCAAATGATGGGATATTACTTCGCAACCATATCCCAAGAATAC
        W  Y  R  L  P  K  V  G  M  I  A  A  N  D  G  I  L  L  R  N  H  I  P  R  I
451     TCAAAAAGCATTTCCGAGAAAAGCCTTATTATGTGGATCTGCTCGATTTATTTAATGAGGTAGAATTCCAGACAA
        L  K  K  H  F  R  E  K  P  Y  Y  V  D  L  L  D  L  F  N  E  V  E  F  Q  T
526     CCTCTGGACAGATGATAGATCTGATCACCACACTGGTAGGAGAAAAAGATCTATCAAAGTACTCATTGCCTCTTC
        T  S  G  Q  M  I  D  L  I  T  T  L  V  G  E  K  D  L  S  K  Y  S  L  P  L
601     ACCGTCGGATTGTTCAGTACAAAACTGCTTACTACTCATTTTACCTTCCAGTGGCCTGTGCCCTTCTTATGGCAG
        H  R  R  I  V  Q  Y  K  T  A  Y  Y  S  F  Y  L  P  V  A  C  A  L  L  M  A
676     GTGAGAAACTGGACAATCATGTTGATGTGGGAACATACTTGTTGAAATGGGAATTTATTTCAAGTGCAGGATG
        G  E  K  L  D  N  H  V  D  V  G  N  I  L  V  E  M  G  I  Y  F  Q  V  Q  D
751     ATTATCTGGATTGTTTTGGTGATCCTGAGGTGATTGGTAAGATTGGAACTGATATCGAAGATTTTAAGTGCTCTT
        D  Y  L  D  C  F  G  D  P  E  V  I  G  K  I  G  T  D  I  E  D  F  K  C  S
826     GGTTGGTTGTGAAAGCACTGGAACTTGTGAACGATGAACAAAAGAAGTTATTATATGAGAACTATGGTAAACAGG
        W  L  V  V  K  A  L  E  L  V  N  D  E  Q  K  K  L  L  Y  E  N  Y  G  K  Q
901     ATCCAGCCTGTGTAGCAAAAGTGAAGGAGCTTTATGAAACTCTCAATCTTCAGGATGTATTTGCAGATTATGAGA
        D  P  A  C  V  A  K  V  K  E  L  Y  E  T  L  N  L  Q  D  V  F  A  D  Y  E
976     GCAAGAGTTATGAAAAGCTAATCAAATTCATTGAAGCTCATTCAAGTACAGCAGTACAAGCAGTGTTGAAATCTT
        S  K  S  Y  E  K  L  I  K  F  I  E  A  H  S  S  T  A  V  Q  A  V  L  K  S
1051    TCTTGGCAAAGATATATAAGAGGGAGAAGTAGGAGAGAGAGATTCAAAGTGTAAACCTGAAAATATTCATTCCCA
        F  L  A  K  I  Y  K  R  E  K  *
1126    aaatgttgggatgttgtgttgtaagttgtatcttatgaacatcagctttcttgctttggcttctgagtctccctt
1201    aacttgctttctgtattgtagatcaggaagctgtaatactactcaaataaactagctgcattcctgtgcaacaac
1276    cgagaatgcagcaaaatgtcgcttccagtgtttgttttgcttctgtttttggaggaaaaataaaatgtattttgt
1351    gtctttacccaattttctatgtatccatgaaatctctaggcatccactttgagttgcatgttatttagtgttttc
1426    ctggccaaaacttctcataccaatgtactaaccaggtaaagaaaagccacaacaaaaggccaaactgcagagtgc
1501    acttcatactgtatgggatgtcctgccgtggggaaagatggccccagctggtttgaattgatcttttggatgcta
1576    tacaaacctgtcaccc
```

注：起始密码子和终止密码子下划线突出显示。

Note: The initial codon and the stop codon are underlined.

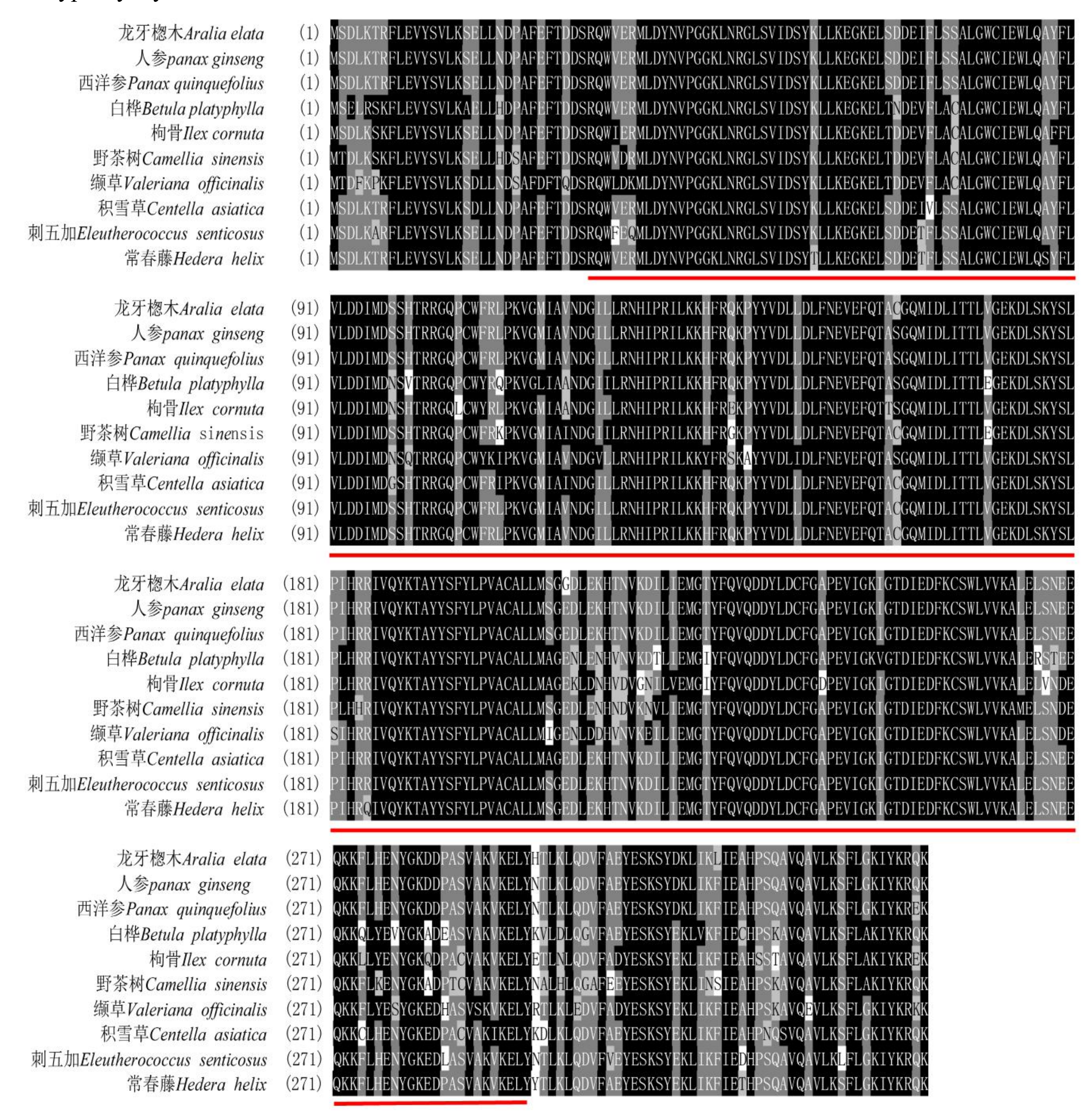
图 1　*IcFPS1* 基因 cDNA 序列和推测的氨基酸序列。

Fig. 1　The cDNA and deduced amino acid sequence of *IcFPS1*

2.2 构骨 IcFPS1 蛋白质理化性质和结构分析

IcFPS1蛋白质含有342个氨基酸。在线网站分析表明，IcFPS1蛋白质的分子量和等电点分别为39.58 kDa和5.18。蛋白质不稳定系数为33.87，该蛋白质为稳定蛋白。SignalP 4.1 Server信号肽预测结果发现IcFPS1蛋白不含有信号肽，蛋白质疏水性分析显示IcFPS1为亲水蛋白。蛋白质跨膜区域分析结果表明，IcFPS1蛋白不含有跨膜区域。通过SOPMA工具分析该蛋白质二级结构，分析结果表明IcFPS1蛋白主要由α螺旋、无规则卷曲、延伸链和β转角结构组成，其所占比例分别为65.5%、24.56%、6.73%和3.22%。同源比对分析通过在线工具BlASTP（NCBI）和Align X（Vetctor NTI 11.5）完成。用NCBI的Conserved Domain Search工具分析

蛋白质保守域，结果显示IcFPS1蛋白质属于Isoprenoid_Biosyn_C1超级家族的成员，含有Polyprenyl synthetase保守区域（图2下划线区域），表明*IcFPS1*参与类异戊二烯的生物合成。



注：一致氨基酸用白色前景和黑色背景指示。保守的氨基酸用白色前景和灰色背景表示。非相似氨基酸用黑色前景和白色背景表示。

Note: The completely identical amino acids are indicated with white foreground and black background. The conserved aminoacids are indicated with white foreground and grey background. Non-similar amino acids are indicated with black foreground and white background.

图2　FPS氨基酸序列的多重比对

Fig. 2　MuItipIe aIignment of amino acid sequences of FPS

2.3 枸骨 IcFPS1 蛋白质的同源比对

同源比对发现，该蛋白质与其他植物的FPS蛋白质相似性较高（图2）。其中枸骨IcFPS1蛋白质和西洋参（ADJ68004）、人参（AAY87903）、常春藤（APV45530）、龙牙楤木

chinaXiv:201809.00104v1

chinaXiv:201809.00104v1

（ADK12004）、积雪草（AAV58896）、白桦（AKQ62666）、野茶树（ANA11766）、刺五加（AEY77151）和缬草（AIU63880）的FPS蛋白质之间的相似性比分别为89%，88%，87%，87%，87%，87%，87%，87%和86%。不同物种之间FPS蛋白有较高的一致性，暗示在功能上可能也是相同或相似的。

2.4 IcFPS1 蛋白质的系统分析

系统进化树采用ClustaIX 2.0和MEGA 6.0软件构建的，目的是进一步探索FPS蛋白质在不同物种之间的进化关系。如图3所示，所有的FPS蛋白都来自于一个共同的祖先，不同物种的FPS蛋白质也被清晰地归类到三个分支，分别为植物、动物和真菌（图3）。系统进化树分析显示枸骨FPS1蛋白与被子植物界双子叶植物五加科的FPS蛋白亲缘关系最近，聚类在同一分支上；而蔷薇科的玫瑰、梅、白梨的FPS蛋白聚类到另一分支上。该结果表明，FPS1蛋白可能与五加科的FPS蛋白质在功能上更为接近。枸骨IcFPS1在功能上也可能与五加科植物的FPS蛋白相同，参与调控三萜皂苷的合成代谢。

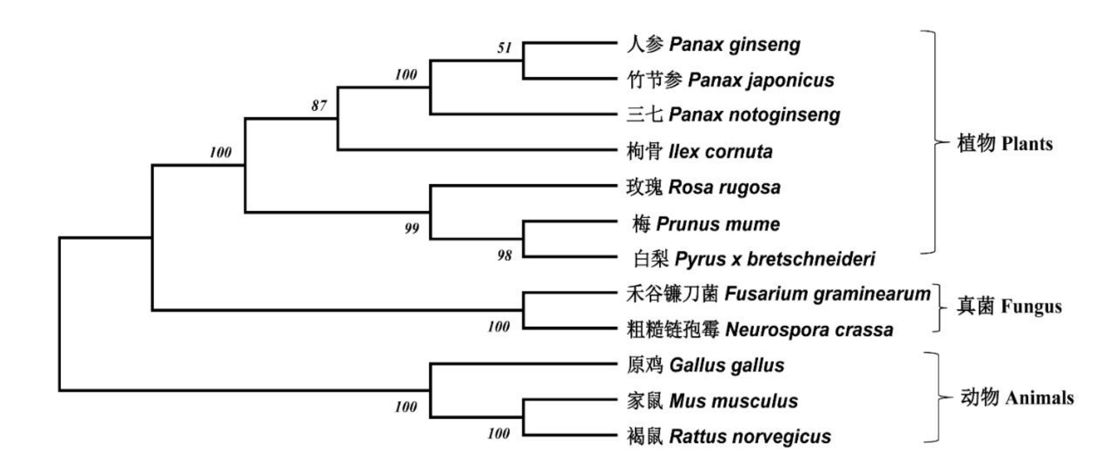


图. 3　不同物种 *FPS* 基因的系统进化树

Fig. 3　Phylogenetic tree *FPS* gene from different species

2.5 枸骨 IcFPS1 蛋白质互作网络分析

利用STRING蛋白互作数据库对枸骨IcFPS1蛋白进行相互作用分析，物种参数选择模式植物拟南芥，构建了的蛋白互作网络（图4）。IcFPS1蛋白可以与9个蛋白互作，其中IPP1、IPP2、GGPS3、GGPS6和ERA1都是植物类异戊二烯合成途径的调节酶，该互作网络表明枸骨IcFPS1蛋白可能与这些蛋白存在一些相似的功能，或共同参与植物类异戊二烯的合成代谢过程。

chinaXiv:201809.00104v1

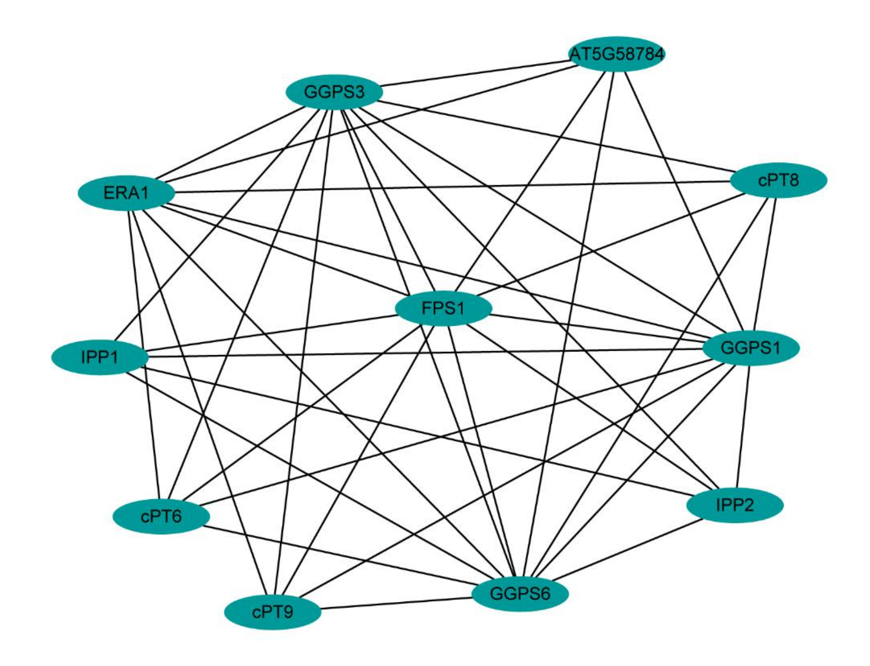


图. 4　IcFPS1 蛋白质互作网络

Fig. 4 Protein-protein interaction network of IcFPS1

2.6 *IcFPS1* 的组织表达分析

为了研究 *IcFPS1* 基因的各个组织器官的表达水平，提取枸骨的根、茎、叶、雄花、雌花的总 RNA，使用反转录试剂盒获得到 cDNA，利用 qRT-PCR 技术测定枸骨各组织器官中 *IcFPS1* 基因的表达水平。qRT-PCR 分析结果发现，*IcFPS1* 基因在各个组织器官中都有表达。其中在枸骨根中的基因表达量最高，叶中表达量其次，雄花中较低，在茎和雌花中的表达量最低（图 5）。枸骨的主要药用部位是根和叶片，本研究中 *IcFPS* 基因也在这两个部位中表达量较高。因此，推测 *IcFPS* 基因可能参与了枸骨三萜类物质的生物合成调控，是枸骨三萜皂苷合成代谢中的一个关键酶基因。

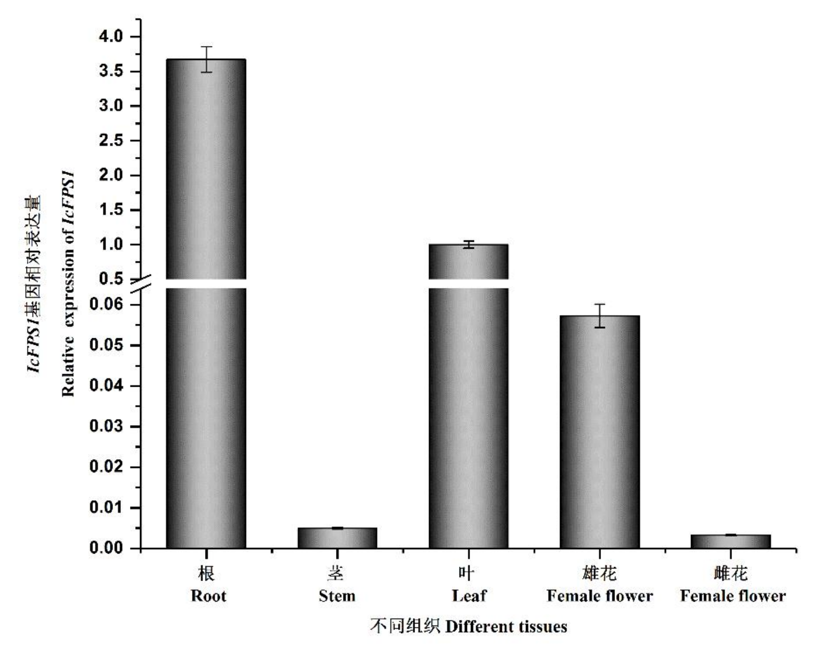


图 5　枸骨不同组织中 *IcFPS1* 基因的表达模式

Fig. 5　Expression pattern of *IcFPS1* gene among different tissues of *Ilex cornuta*

3. 讨论与结论

FPS 参与类异戊二烯生物合成途径，属于植物次生代谢三萜皂苷与甾醇合成途径中的一个限速酶，也是三萜皂苷合成生物学研究的其中一个重要酶。本研究克隆得到枸骨的 *IcFPS1* 基因，对其进行了生物信息学分析和功能预测。结果表明，IcFPS1 蛋白质属于 Isoprenoid_Biosyn_C1 超级家族，与其他植物尤其是药用植物的 FPS 蛋白质具有较高的相似性，与五加科的 FPS 蛋白亲缘关系较近，结合蛋白质互作网络分析，证实枸骨 IcFPS1 参与类异戊二烯代谢途径，可能参与调控枸骨三萜皂苷的生物合成。

qRT-PCR 分析结果表明 *IcFPS1* 基因在枸骨各个器官组织中的表达量具有部分差异性，其中在根中的基因表达量最高，其次是叶，在茎和雌花中表达量最少，这种现象或许与 *FPS* 在三萜皂苷代谢途径中的功能有关。目前已在许多植物上进行了 *FPS* 基因的分离和功能验证。Cunillera 等（1996）克隆了拟南芥 *FPS* 基因，qRT-PCR 分析结果表明拟南芥 *FPS1* 和 *FPS2* 基因在幼苗的根、茎、叶和花中都表达；其中，*FPS1* 基因在根和花中最高表达，*FPS2* 基因表达水平较低，具有组织表达差异性，这与我们的研究结果相似。在白木香 *FPS* 基因功能研究中，组织表达结果表明 *FPS* 基因的表达量最高是根，其次是茎，表达量最少是叶，推测该基因在根和茎两个组织中发挥生物学功能，与白木香的形成部位相关（杨欣等，2013)；在人参中，*FPS* 基因表达分析结果表明该基因在叶的表达量最多（杨林林等，2017)，这与本文研究中根的表达量最多不同。在三七 *FPS* 基因的功能研究时发现，在三七细胞中过表达 *FPS* 基因可以促进三七总皂苷积累（杨延等，2015）。周秘等（2013）对刺五加法尼基焦硫酸合酶研究发现，*PFS* 基因刺五加整个发育时期的表达量与其皂苷含量呈现基本相似的变化趋势，证实 FPS 是刺五加三萜皂苷生物合成的一个关键酶。这些结果表明 *FPS* 基因的表达与三萜化合物的生物合成密切相关。因此可以推断，枸骨的 *IcFPS1* 基因也可能参与了枸骨三萜类物质的生物合成。

总之，本研究克隆获得了枸骨的 *IcFPS1* 基因，对其核酸序列和蛋白质和进行了生物信息学分析预测，构建了枸骨 IcFPS1 蛋白质互作网络；并分析了 *IcFPS1* 基因在枸骨不同组织部位中的表达水平，该研究为进一步弄清 *IcFPS1* 基因在枸骨三萜皂苷生物合成中的作用奠定了基础，为提高枸骨三萜皂苷含量提供了一定的理论依据。

chinaXiv:201809.00104v1

参考文献

CHEN L, LAN XW, LI K, et al, 2006. Genetic cloning and sequence analysis of farnesyl pyrophosphate synthase in *Panax notoginseng* [J]. Chin Trad Herb Drugs, 37(7): 1080-1083. [陈莉，蓝秀万，李珅，等，2006．三七法呢基焦磷酸合酶的基因克隆及序列分析[J]．中草药，37(7)：1080-1083．]

CUNILLERA N, ARRÓ M, DELOURME D, et al, 1996. Arabidopsis thaliana contains two differentially expressed farnesyl-diphosphate synthase genes [J]. J Biol Chem, 1996, 271(13): 7774-7780.

JIANG D, TANG YL, TAO CC, et al, 2014. Cloning and sequence analysis of farnesyl pyrophosphate synthase from *Gynostemma pentaphyllum* [J]. Lett Biotechnol, 25(2): 198-202. [蒋东，唐银琳，陶晨陈，等，2014．绞股蓝法呢基焦磷酸合酶基因的克隆及其序列分析[J]．生物技术通讯，25(2)：198-202．]

LI GW, WU T, XIE Y, et al, 2015. Leaves of *Ilex cornuta*：research advances [J]. J Int Pharm Res, 38(5): 356-361. [李国文，吴弢，谢燕，等，2015．中药枸骨叶研究进展[J]．国际药学研

究杂志，38(5)：356-361．]

LIVAK KJ, SCHMITTGEN TD, 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method [J]. Methods, 25(4): 402-408.

PENG GQ, YANG DM, 2011. Medicinal effect and health protection of *Ilex cornuta* [J]. Acta Agric Jiangxi, 23(6): 79-82. [彭国全，杨冬梅，2011．枸骨的药用功效与保健作用[J]．江西农业学报，23(6)：79-82．]

YANG LL, YANG LM, MA XJ, et al, 2017. Correlation between *Panax ginseng* farnesyl diphosphate synthase gene expression and ginsenoside content [J]. J Jilin Agric Univ, 39(6): 695-708. [杨林林，杨利民，马秀杰，等，2017．人参法尼基焦磷酸合成酶基因的表达及其与皂苷含量的关系[J]．吉林农业大学学报，39(6)：695-708．]

YANG X, WEI JH, LIU J, et al, 2013. Cloning and expression analysis of farnesyl pyrophosphate synthase from *Aquilaria sinensis* [J]. Chin J Chin Mat Med, 38(19): 3251-3255. [杨欣，魏建和，刘娟，等，2013．白木香法呢基焦磷合酶基因 *AsFPS1* 的克隆及表达分析[J]．中国中药杂志，38(19)：3251-3255．]

YANG XM, 2013. Study on rapid propagation of *Matricaria chamomilla* L. and genetic transformation of *FPS* gene in Tobacco [D]. Anhui: Anhui Agric Univ: 26-31. [杨秀梅，2013．洋甘菊快速繁殖及 FPS 基因在烟草中的转化研究[D]．安徽：安徽农业大学：26-31．]

YANG Y, LIU DQ, GE F, et al, 2015. Effect of over-expressing farnesyl pyrophosphate synthase (*FPS*) gene of *Panax notoginseng* cell on saponin synthesis [J]. Mod Food Sci Technol, 8: 59-64. [杨延，刘迪秋，葛锋，等，2015．三七细胞中过表达 *FPS* 基因对皂苷合成的影响[J]．现代食品科技，31(8)：59-64．]

ZHANG ZB, HOU L, CUI QH, et al, 2015. Bioinformatics analysis of triterpenoid saponins biosynthesis pathway in herbal medicines [J]. Chin Trad Patent Med, 37(6): 1255-1261. [张召宝，侯林，崔清华，等，2015．中药三萜皂苷合成通路的生物信息学分析[J]．中成药，37(6)：1255-1261．]

ZHOU M, CHAI LH, XIU LS, et al, 2013. Expression level of *Eleutherococcus senticosus* farnesyl diphosphate dynthase gene and its correlation with saponin content [J]. J Henan Agric Sci, 42(12): 106-109. [周秘，柴丽花，修乐山，等，2013．刺五加法尼基焦磷酸合酶基因的表达及其与皂苷含量的相关性分析[J]．河南农业科学，42(12)：106-109．]

ZUO WJ, MEI ML, ZENG YB, et al, 2011. Research advances of the chemical constituents and pharmacological activities of *Ilex cornuta* Lindl. et Paxt [J]. J Anhui Agric Sci, 39(27): 16560-16562. [左文健，梅文莉，曾艳波，等，2011．枸骨的化学成分和药理活性研究进展[J]．安徽农业科学，39(27)：16560-16562．]

chinaXiv:201809.00104v1